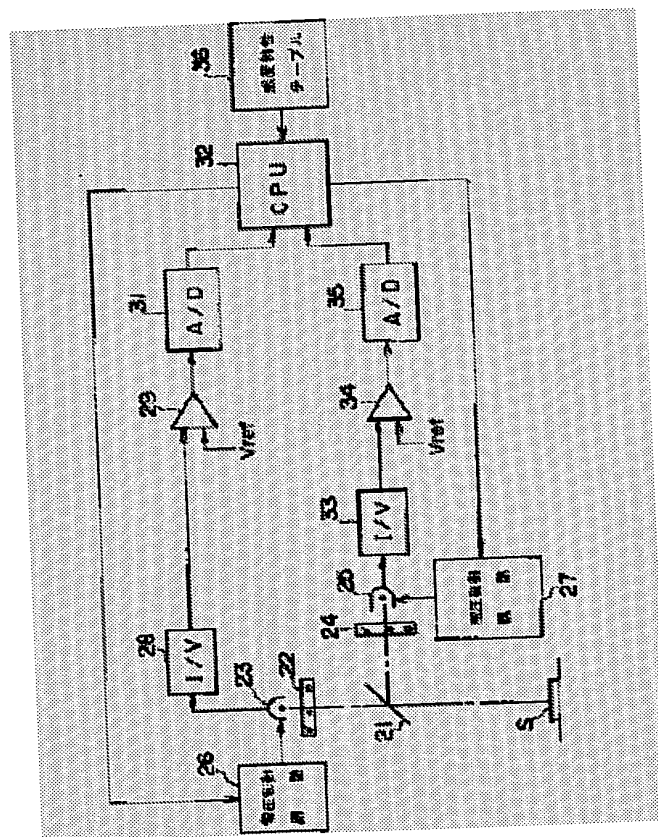


MULTIPLE-WAVELENGTH LIGHT MEASURING INSTRUMENT

Patent number: JP6317526
Publication date: 1994-11-15
Inventor: IZUNO GUNPEI
Applicant: OLYMPUS OPTICAL CO LTD
Classification:
 - international: G01N21/64
 - european:
Application number: JP19930104636 19930430
Priority number(s):

Abstract of JP6317526

PURPOSE: To provide a multiple-wavelength light measuring instrument which can obtain an accurate measured value even if the difference in incidence fluorescent intensity between photo multiplexers deviates from the dynamic range of the photo multiplexers.
CONSTITUTION: The title instrument is provided with a light branch element 21 branching from a body S to be inspected, a plurality of wavelength selection elements 22 and 24 where the light branched by the light branching element 21 enters, a plurality of photoelectric converters 23 and 25 for detecting the light intensity of the wavelength selected by the wavelength selection elements 22 and 24, a sensitivity control means 32 for controlling the sensitivity of the photoelectric converters 23 and 25 based on the output of the photoelectric converters 23 and 25 individually, and compensation means 32 and 36 for compensating the output of the photoelectric converters 23 and 25 whose sensitivity is controlled by the sensitivity control means 32 to a measured value at a reference sensitivity of the photoelectric converters 23 and 25.



(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-317526

(43)公開日 平成6年(1994)11月15日

技術表示箇所

(51)Int.Cl.⁵
G 0 1 N 21/64

識別記号 庁内整理番号
Z 7414-2 J

F I

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平5-104636

(22)出願日 平成5年(1993)4月30日

(71)出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72)発明者 伊津野 郡平

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ
ンパス光学工業株式会社内

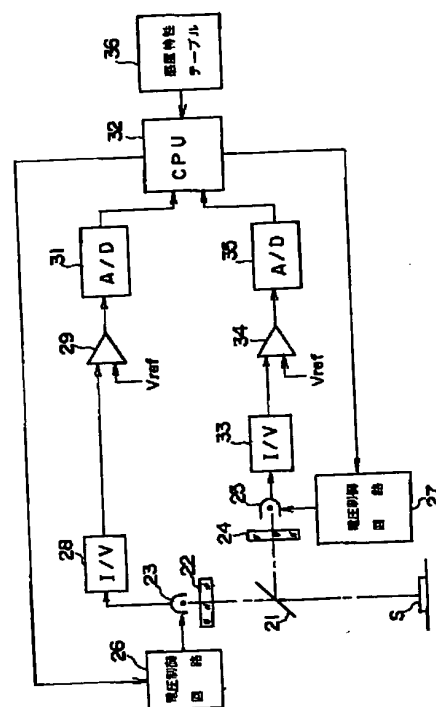
(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦

(54)【発明の名称】 多波長測光装置

(57)【要約】

【目的】本発明の目的は、フォトマル間の入射蛍光強度の差がフォトマルのダイナミックレンジから逸脱する場合にも正確な測定値を得ることのできる多波長測光装置の提供にある。

【構成】被検査体Sからの分岐する光分岐素子21と、この光分岐素子21で分岐された光が入射する複数の波長選択素子22、24と、これら各波長選択素子22、24により選択された波長の光強度を夫々検出する複数の光電変換器23、25と、これら各光電変換器23、25の出力に基づいて前記各光電変換器23、25の感度を個々に制御する感度制御手段32と、この感度制御手段32が感度制御した光電変換器23、25の出力を当該光電変換器23、25の基準感度での測定値に補正する補正手段32、36とを具備して構成される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検査体からの光を複数の分岐する光分岐素子と、この光分岐素子で分岐された光の各光路上に配置され各々異なる波長選択特性を持つ複数の波長選択素子と、これら各波長選択素子により選択された波長の光強度を夫々検出する複数の光電変換器と、これら各光電変換器の出力に基づいて前記各光電変換器の感度を個々に制御する感度制御手段と、この感度制御手段が感度制御した光電変換器の出力を当該光電変換器の基準感度での測定値に補正する補正手段とを具備したことを特徴とする多波長測光装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、複数の光電変換器を備えた多波長測光装置に係り、さらに詳しくは光強度に応じてダイナミックレンジを変更する多波長測光装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 被検査体となる細胞に所定の蛍光試薬を投与して、その細胞に励起光（波長340nm）を照射すると、その細胞の蛍光像が図6に示す如く変化する蛍光スペクトルの光を発することが知られている。この蛍光スペクトルの2波長間の比は細胞内に含まれるカルシウムイオン濃度に応じた値となる。そこで上記蛍光像を2波長測光して2波長間の測光値の比を求めることにより、細胞内のカルシウムイオン濃度を測定することができる。2波長測光機能を備えた蛍光顕微鏡装置が特開平2-28542号公報に記載されている。

【0003】 図5は、特開平2-28542号公報に記載された蛍光顕微鏡装置の概略的な構成を示している。この蛍光顕微鏡装置は水銀ランプ1の光をNDフィルタユニット2、励起フィルタユニット3及びダイクロイックミラー4を介して試料5に照射する。試料5に所定の蛍光試薬を投与しておき、波長340nmの励起光を励起フィルタユニット3で選択しておけば、励起された試料5からカルシウムイオン濃度等に応じて蛍光スペクトルが図6に示す如く変化する光が発せられる。試料5からの光はダイクロイックミラー4を通過し吸収フィルタユニット6を介してTVカメラ7に入射する。

【0004】 透過波長が410nm、460nmの2つの吸収フィルタ6a、6bを吸収フィルタユニット6に設け、吸収フィルタ6a、6bを所定速度で光路上に交互に挿入することにより波長410nmの蛍光強度と波長460nmの蛍光強度とに応じた信号がTVカメラ7から出力される。この2信号の比からカルシウムイオン濃度を測定できる。

【0005】 ところで、互いに異なる2波長の蛍光強度を測定するため、励起光の強度や試料5の状態によっては、一方の波長の光強度がTVカメラ7のダイナミックレンジに入らなくなる場合もある。

【0006】 そこで上述した蛍光顕微鏡装置では、TVカメラ7のダイナミックレンジを有効に使用するため、NDフィルタユニット2で励起光強度を調整している。また、2つの光電子増倍管（以下、フォトマルと呼称する）を使って2波長測定を行う蛍光顕微鏡装置が特開昭55-74448号公報に記載されている。この公開公報に記載された蛍光顕微鏡装置は、図7に示すように構成され、光源10からの光を励起フィルタ11、ダイクロイックミラー12を介して試料13に入射し、その試料13からの蛍光をダイクロイックミラー12、ハーフミラー14を介して光分割プレート15に入射している。光分割プレート15で分割された一方の光を吸収フィルタ16を介してフォトマル17で検出し、もう一方の光を吸収フィルタ16と異なる透過波長域を持つ吸収フィルタ18を介してフォトマル19で検出している。

【0007】 2つのフォトマル17、19の各々で検出された各波長の蛍光強度を成分関係決定装置20に入力して互いの強度比をCRT画面上にプロットし、そのプロット位置（強度比）を検出して標本が目的のものであるか否かを判断している。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、図5に示す蛍光顕微鏡装置は、2波長の双方の蛍光強度をTVカメラ7のダイナミックレンジ内に収めるために励起光強度をNDフィルタを使って調整しているので、光量損失が大きく、励起光強度が不十分となって良好な蛍光像が得られなくなる可能性がある。

【0009】 また図7に示す蛍光顕微鏡装置は、励起光の光量損失はほとんど問題とならないが、各フォトマル17、19の感度が固定となっているため、蛍光強度が大きすぎてフォトマル17、19のダイナミックレンジを越えてしまうような場合、又は蛍光強度が小さすぎて十分な検出精度を得られなくなるような場合には対処できないので、そのような時は測定精度が著しく低下するという問題がある。

【0010】 本発明は以上のような実情に鑑みてなされたもので、励起光の光量損失が小さく常に良好な蛍光像を得ることができると共に、蛍光強度がTVカメラやフォトマルのダイナミックレンジから逸脱しているような場合であっても高い測定精度を実現できる多波長測光装置を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】 上記目的を達成するために本発明の多波長測光装置は、被検査体からの光を複数の分岐する光分岐素子と、この光分岐素子で分岐された光の各光路上に配置され各々異なる波長選択特性を持つ複数の波長選択素子と、これら各波長選択素子により選択された波長の光強度を夫々検出する複数の光電変換器と、これら各光電変換器の出力に基づいて前記各光電変

3
換器の感度を個々に制御する感度制御手段と、この感度制御手段により感度制御された光電変換器の出力を当該光電変換器の基準感度での測定値に補正する補正手段とを具備する構成とした。

【0012】

【作用】本発明の多波長測光装置では、被検査体からの光が光分岐素子により複数に分岐され、その分岐されたそれぞれの光が対応する各波長選択素子に入射して特定波長が選択される。そして各波長選択素子で選択された各波長の光強度が各々対応する光電変換器で検出される。各光電変換器の感度は感度制御手段により光電変換器の出力に基づいて制御される。すなわち、感度制御手段は光電変換器の出力から入射光強度がダイナミックレンジを越えるほど大きいのか、又は入射光強度が十分な測定精度が得られないほど小さいのかを判断することができる。入射光強度が大きすぎる場合には該当する光電変換器の感度を下げる。また、入射光強度が小さすぎる場合には該当する光電変換器の感度を上げる。このような感度制御により入射光強度が光電変換器のダイナミックレンジから逸脱するのを防止することができる。感度制御手段により感度制御が行われた光電変換器の出力は補正手段により当該光電変換器の基準感度での測定値に補正される。

【0013】

【実施例】以下、本発明の実施例について説明する。図1は本発明の一実施例に係る多波長測光装置の全体構成を示している。本実施例の多波長測光装置は、被検査体としての発光体Sからの光をダイクロイックミラー21で透過成分と反射成分の2成分に分岐する。ダイクロイックミラー21の透過光を、その透過光の光路上に配置された第1の吸収フィルター22を通して第1のフォトマル23に入射する。またダイクロイックミラー21の反射光を、その反射光の光路上に配置された第2の吸収フィルター24を通して第2のフォトマル25に入射する。第1の吸収フィルター22は透過成分の有する波長域のうち特定波長域の光のみを透過する波長選択特性を有している。第2の吸収フィルター24は反射成分の有する波長域のうち第1の吸収フィルター22と異なる特定波長域の光のみを透過する波長選択特性を有している。

【0014】第1のフォトマル23は電圧制御回路26から動作に必要な電圧が印加される。電圧制御回路26は後述するCPUから受信する感度指令信号に基づいて第1のフォトマル23への印加電圧を制御する。なお第1のフォトマル23は、入射光を受光する蛍光面と、その蛍光面から発せられる光電子を増倍する電極群とから構成されており、電極群両端間の電圧勾配を変化させることにより、光電子増倍率すなわち感度が変化する。同様に、第2のフォトマル25は電圧制御回路27から動作電圧が印加されており、その印加電圧はCPUからの

感度指令信号に基づいて変化される。

【0015】第1のフォトマル23で検出した測光値は電流/電圧変換回路28で電圧信号に変換され、その電圧信号が比較回路29に入力する。比較回路29は第1のフォトマル23のダイナミックレンジの最大値近傍に定められたしきい値 V_{ref} が設定されており、入力する電圧信号の電圧値がしきい値 V_{ref} を越えるまでは電圧信号を出力し、電圧信号の電圧値がしきい値 V_{ref} を越えると電圧信号の出力を停止する。この比較回路29から出力される電圧信号はA/D変換器31を介してCPU32に入力している。

【0016】また第2のフォトマル25で検出した測光値は、電流/電圧変換回路33で電圧信号に変換され、その電圧信号が比較回路34に入力する。比較回路34は第2のフォトマル25のダイナミックレンジの最大値近傍に定められたしきい値 V_{ref} が設定されており、入力する電圧信号に対して上記比較回路35と同様に動作する。この比較回路35から出力される電圧信号はA/D変換器35を介してCPU32に入力している。

【0017】CPU32は図2及び図3に示すフローチャートに基づいて第1、第2のフォトマル23、25の感度補正を行うと共に、各フォトマル23、25で検出した蛍光強度と感度特性テーブル36に格納された感度特性データとを用いて後述する演算を実施する。

【0018】感度特性テーブル36には図4に示すような第1、第2のフォトマル23、25の感度特性が格納されている。図4(a)の下段のグラフは第1のフォトマル23の感度特性を示している。横軸の印加電圧と縦軸の蛍光強度との比がフォトマル感度となる。図4

(b)の下段のグラフが第2のフォトマル25の感度特性を示している。

【0019】次に、細胞に所定の蛍光試薬を投与し該細胞に所定波長の励起光を照射し、図6に示すような蛍光スペクトルの蛍光像を細胞から発光させ、その蛍光像を2波長測光して細胞内のカルシウムイオン濃度を測定する場合の動作について説明する。

【0020】先ず、第1のフォトマル23と第2のフォトマル25を同一感度に設定する。そのため、感度特性テーブル36に格納された第1のフォトマル23の感度特性と第2のフォトマル25の感度特性とから双方の感度が同じになる基準電圧HV1、HV2を決定する。本明細書では、この感度を基準感度と呼ぶ。例えば、基準電圧HV1、HV2に応じた基準感度に、第1のフォトマル23のダイナミックレンジの中間値と第2のフォトマル25のダイナミックレンジの中間値との中間の値を用いる。

【0021】第1のフォトマル23は電圧制御回路26により第1の基準電圧HV1が印加され、第2のフォトマル25は電圧制御回路27により基準電圧HV2が印加される。

5

【0022】第1、第2のフォトマル23、25に基準電圧HV1、HV2が印加されると、各フォトマルへの入射光の蛍光強度が電圧信号に変換され、その電圧信号が各比較回路29、34に入力する。電圧信号の信号値で表された各蛍光強度が各々のフォトマルのダイナミックレンジ内であれば、CPU32により各フォトマルの測光値の比が演算される。

【0023】ここで、蛍光像の蛍光スペクトルが図6に示すような波長分布を示すので、第1の吸収フィルター22の選択波長を410nmに設定し、第2の吸収フィルター24の選択波長を460nmに設定すれば、又は410nmと480nmに設定すれば、2波長間の蛍光強度比を最も効率良く測定できる。

【0024】CPU32により演算された2波長間の強度比は、予め用意された2波長間の強度比とカルシウムイオン濃度との関係（不図示）から、カルシウムイオン濃度に変換することができる。

【0025】今、第1の吸収フィルター22を透過する選択波長の蛍光強度が、第1のフォトマル23の検出上限レベルを越えたとする。この場合、CPU32は図2に示すフローチャートに基づいて感度補正処理を実施する。すなわち、図4(a)の上段に示すように、第1のフォトマル23に入射する蛍光強度が、第1のフォトマル23の検出上限レベルを越えたと、それまで比較回路29からCPU32へ出力されていた電圧信号の出力が停止される。

【0026】CPU32では比較回路29からの電圧信号が入力しなくなったことにより、蛍光強度が第1のフォトマル23の検出上限レベルを越えたとを検知する(S1)。

【0027】第1のフォトマル23が基準電圧HV1で光量超過となると、比較回路29から電圧信号が再び出力されるまで（しきい値Vrefを下回るまで）第1のフォトマル23の印加電圧を所定の幅で順次下げていく(S2)。電圧信号が比較回路29からCPU32へ再び入力開始したところ（印加電圧HV1'）で感度制御を止め、印加電圧HV1'での電圧信号から蛍光強度IHV1'を測定する(S3)。

【0028】第1のフォトマル23だけ感度が下げられているので、基準感度（基準電圧HV1）での蛍光強度IHV1を予測する(S4)。この予測演算処理を図4(a)の感度特性グラフを使って説明する。

【0029】同図において、

$$\text{IHV1-STD} / \text{HV1} : \text{IHV1-STD}' / \text{HV1}' \\ = \text{IHV1} / \text{HV1} : \text{IHV1}' / \text{HV1}'$$

なる関係が成立するので、下式より蛍光強度IHV1を予測することができる。

【0030】

$$\text{IHV1} = \text{IHV1}' \cdot (\text{IHV1-STD} / \text{IHV1-STD}')$$

この予測した蛍光強度IHV1と第2のフォトマル25で

検出したIHV2との比を算出してカルシウムイオン濃度を求める。

【0031】第2のフォトマル25が基準電圧HV2で光量超過となった場合には、第2のフォトマル25の印加電圧を徐々に下げる。そして比較回路34に入力する電圧信号がしきい値Vrefを下回る印加電圧で蛍光強度を測光し、その測光値から上述した第1のフォトマル23と同様の予測演算処理により、基準電圧HV2での蛍光強度を予測する。

【0032】一方、CPU32はA/D変換器31、35の出力から各フォトマルでの蛍光強度が検出下限レベルを下回っていないか否かを判断している。A/D変換器31、35の出力は各フォトマルでの蛍光強度をデジタル値で表しているため、CPU32はA/D変換器31、35からのデジタル値と所定値（検出下限レベルの蛍光強度に対応したデジタル値）とを比較して、フォトマルでの蛍光強度が検出下限レベルを下回ったことを判断する。

【0033】例えば、図4(b)の上段に示すように、第2の吸収フィルター24を透過する選択波長の蛍光強度が第2のフォトマル25の検出下限レベルを下回ると、CPU32が図3に示すフローチャートに基づいて感度補正処理を実施する。すなわち、第2のフォトマル25が基準電圧HV2で光量不足であると判断すると(T1)、電圧制御回路27を制御して第2のフォトマル25の印加電圧を徐々に上げていく(T2)。そしてCPU32に入力する蛍光強度のデジタル値が所定値を越えたならば、その検出下限レベルを越える印加電圧HV2'での蛍光強度IHV2'を測定する(T3)。

【0034】第2のフォトマル25だけ感度が上げられているので、基準感度（基準電圧HV2）での蛍光強度IHV2を予測する(T4)。この予測演算処理を図4(b)の感度特性グラフを使って説明する。

【0035】同図において、

$$\text{IHV2-STD} / \text{HV2} : \text{IHV2-STD}' / \text{HV2}' \\ = \text{IHV2} / \text{HV2} : \text{IHV2}' / \text{HV2}'$$

なる関係が成立するので、下式より蛍光強度IHV2を予測することができる。

【0036】

$$\text{IHV2} = \text{IHV2}' \cdot (\text{IHV2-STD} / \text{IHV2-STD}')$$

この予測した蛍光強度IHV2と第1のフォトマル23で検出したIHV1との比を算出してカルシウムイオン濃度を求める。

【0037】また第1のフォトマル23の蛍光強度が検出下限レベルを下回った場合も同様に処理される。このように本実施例によれば、蛍光強度が各フォトマルのダイナミックレンジ内に収まらない場合に、フォトマル23、25の感度を補正して蛍光強度をダイナミックレンジ内に収め、感度特性テーブル36を使って同一感度での蛍光強度比を求めるようにしたので、蛍光強度と各フ

7
 オトマル23、25のダイナミックレンジとの関係に制限されることなく、幅広い蛍光強度に対して常に高い測定精度を実現することができる。

【0038】また光路中にNDフィルター等の光量調整素子を挿入しなくてもダイナミックレンジを適合させることができるので、光量損失が小さくなり、常に良好な観察を行うことができるものとなる。

【0039】なお、上記実施例では蛍光標本の蛍光像を2波長測光する場合について説明したが、蛍光標本以外の被検査体の検査にも適用することができる。例えば、結晶基板の不純物を分析する不純物分析装置に用いることができる。

【0040】公知の不純物分析装置では、Arレーザの所定波長の発振光で被検査体を光励起し、光励起された被検査体から放出される自由励起子光(FE線)と束縛励起子光(BE線)とからなるフォトルミネッセンス光(PL光)を分光器で分光し、その分光スペクトルにおけるFE線とBE線の比から不純物を特定している。

【0041】このような不純物分析装置に上述した実施例の多波長測光装置を応用すれば、上述した実施例の効果を不純物分析装置でも得ることができる。すなわち、第1の吸収フィルター22及び第1のフォトマル23と第2の吸収フィルター24及び第2のフォトマル25で、FE線とBE線の強度をそれぞれ測定し、両者の比をCPU32で演算するように構成する。

【0042】このように構成した不純物分析装置によれば、分光器を用いることなく不純物分析装置を構成することができる。また本発明は2波長測光に限定されるも

のではなく3波長以上の測光にも適用できる。

【0043】

【発明の効果】以上詳記したように本発明によれば、励起光の光量損失が小さく常に良好な蛍光像を得ることができると共に、蛍光強度がTVカメラのダイナミックレンジやフォトマルのダイナミックレンジから逸脱しているような場合であっても高い測定精度を実現できる多波長測光装置を提供できる。

【図面の簡単な説明】

10 【図1】本発明の一実施例に係る多波長測光装置の全体構成図である。

【図2】図1に示す多波長測光装置における光量超過時の動作説明図である。

【図3】図1に示す多波長測光装置における光量不足時の動作説明図である。

【図4】図1に示す多波長測光装置に備えられた感度特性テーブルに記憶された感度特性を示す図である。

【図5】従来の蛍光顕微鏡の構成図である。

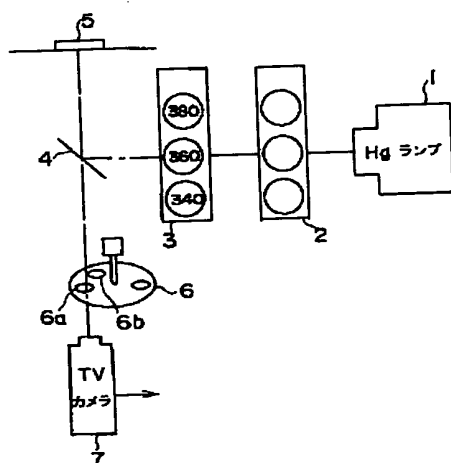
20 【図6】蛍光標本が発する光の蛍光強度と波長との関係を示す図である。

【図7】従来の他の蛍光顕微鏡の構成図である。

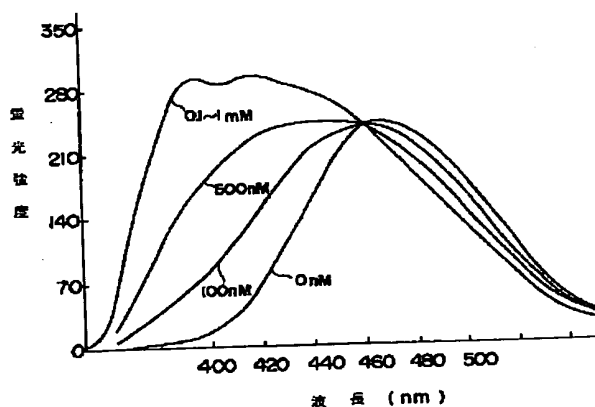
【符号の説明】

21…ダイクロイックミラー、22…第1の吸収フィルター、23…第1のフォトマル、24…第2の吸収フィルター、25…第2のフォトマル、26、27…電圧制御回路、29、34…比較回路、32…CPU、36…感度特性テーブル。

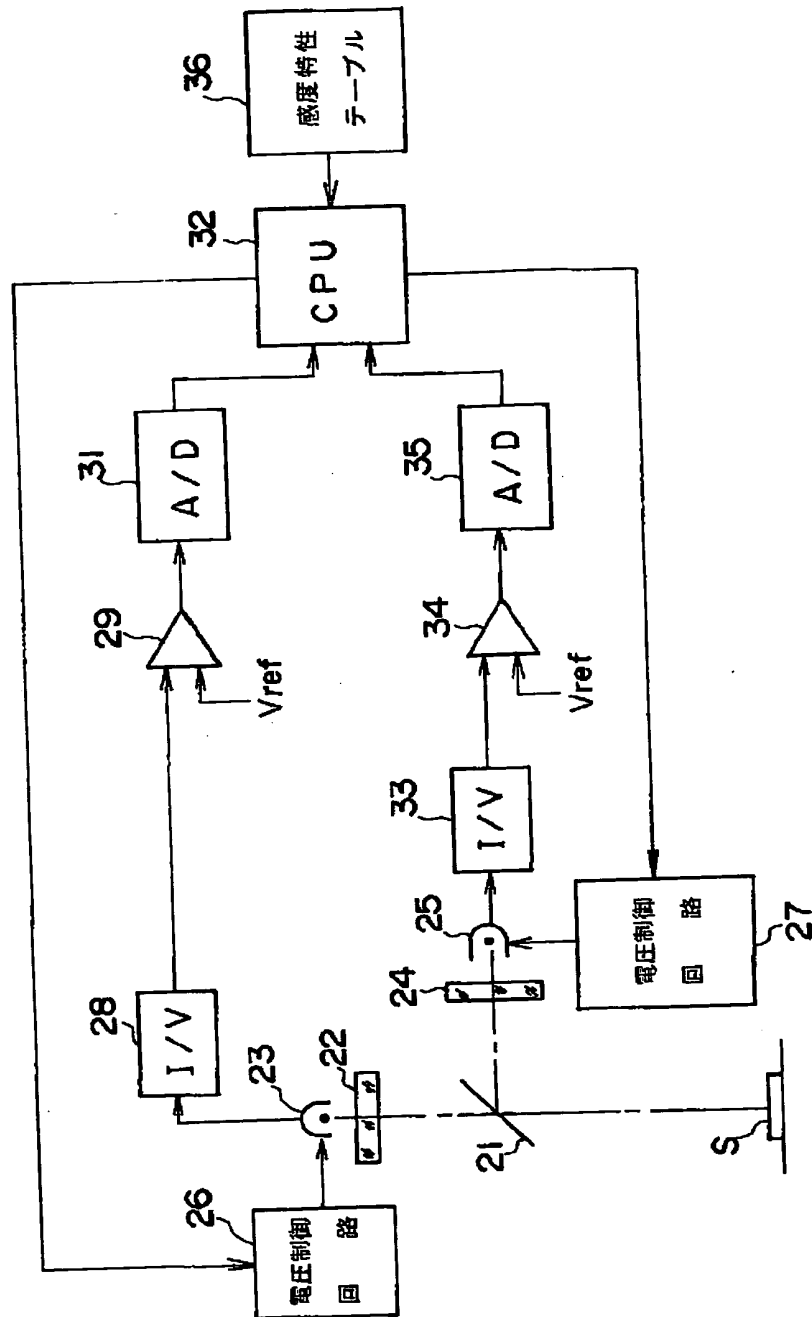
【図5】



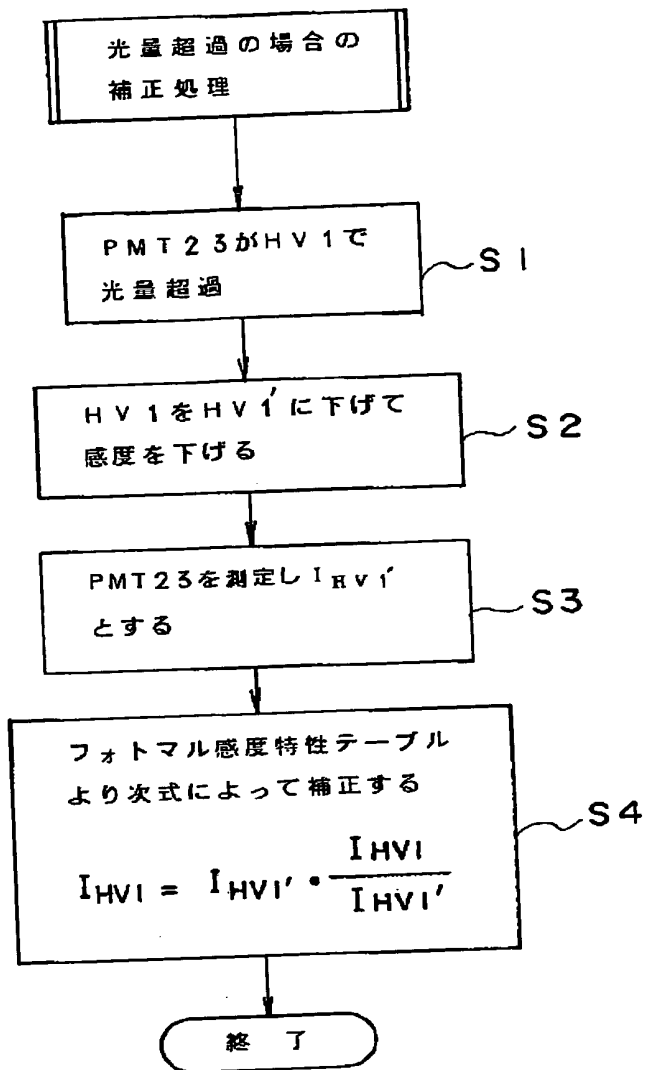
【図6】



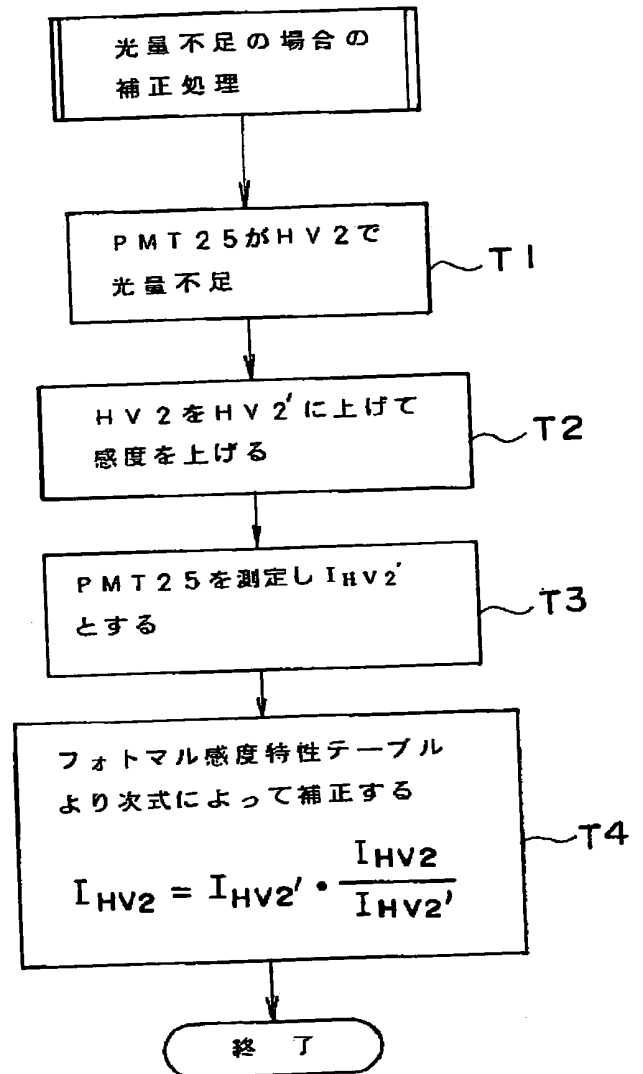
【図1】



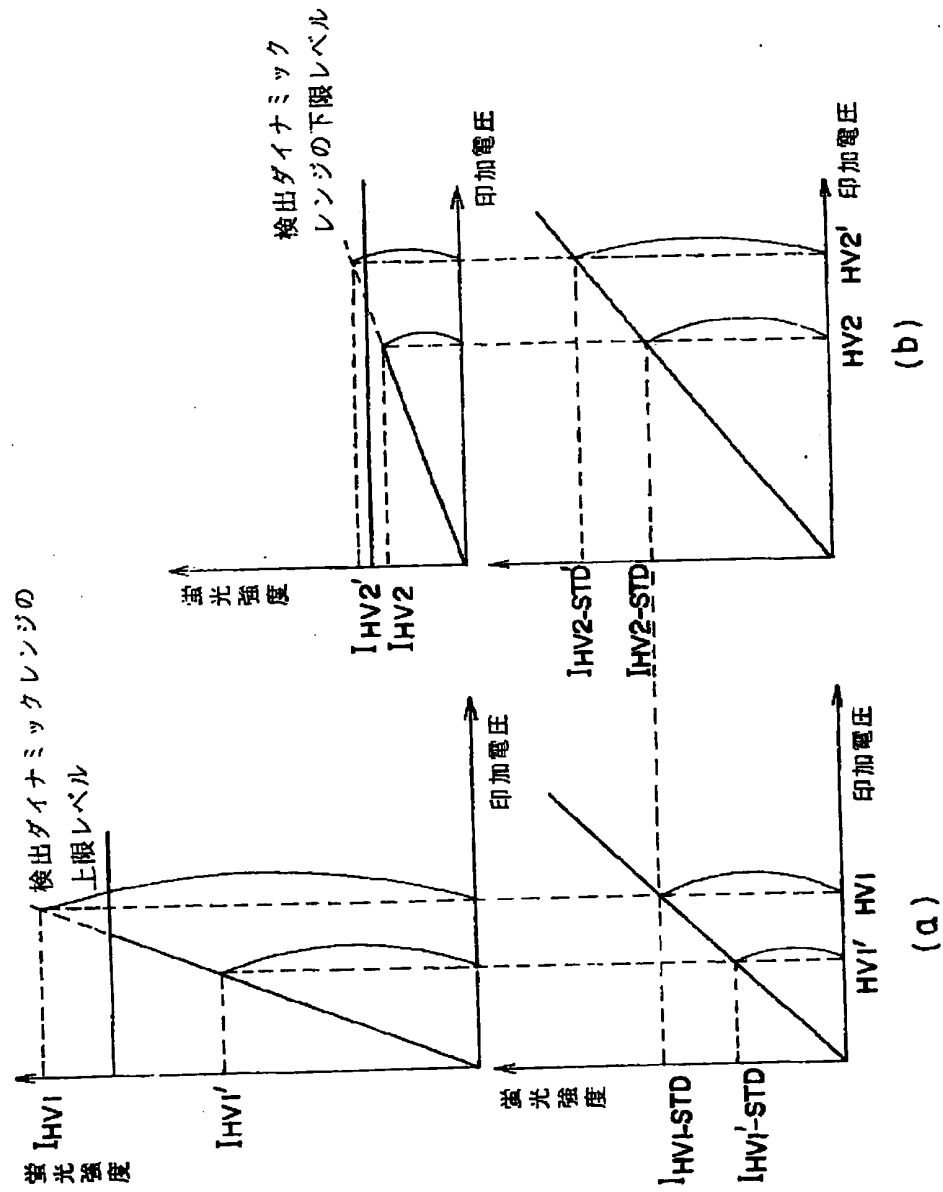
【図2】



【図3】



【図4】



【図7】

